

④公開特許公報(A) 平4-13631

④Int.Cl.
A 61 K 35/78
C 07 G 17/00
I C 12 N 9/99

識別記号 行内整理番号
ADU C 7180-4C
AED Z 8318-4H

④公開 平成4年(1992)1月17日

審査請求 未請求 請求項の数 11 (全9頁)

④発明の名称 アナカルジウム・オクシデンタレ由來の物質

④特 願 平2-113456
④出 願 平2(1990)4月27日

④発明者 梅澤 一夫 東京都渋谷区広尾3-1-2-505
埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1-3-1 東燃株式会社総
合研究所内
④発明者 小谷野 香 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1-3-1 東燃株式会社総
合研究所内
④発明者 原 智子 東京都千代田区一ツ橋1丁目1番1号
東京都文京区小石川4丁目6番10号
東京都渋谷区広尾3-1-2-505
外2名
④出願人 東燃株式会社
④出願人 エーザイ株式会社
④出願人 梅澤 一夫
④代理人 弁理士 川口 雄

明細書

1. 発明の名称

アナカルジウム・オクシデンタレ由來の物質

2. 特許請求の範囲

(1) アナカルジウム・オクシデンタレから得るこ
とができる、下記の物性値:

(i) 脱脂クロマトグラフィー:

$R_f = 1.16$ (粗体シリカゲル、脱脂溶媒クロ
ロホルム:メタノール:酢酸アソニア水 =
10:2:1.15)、

(ii) UVスペクトル:

$\lambda_{max} 310 nm$ (溶媒メタノール)

(iii) ^1H-NMR スペクトル:

溶媒脱脂クロロホルム: $\delta ppm = 0.9, 1.1 -$
1.1, 2.0, 2.75, 3.0, 3.3, 3.6, 3.8,
4.15, 7.3、及び

(iv) 溶媒に対する溶解性:

ヘキサン、クロロホルム、酢酸エチル、メタ
ノール、ジメチルスルホキシドに可溶性であ
り、水に不溶性である

を有し、並びにチロシンキナーゼ阻害活性及び
アーグルコシダーゼ阻害活性を有する物質。

(2) アナカルジウム・オクシデンタレがアナカル
ジウム・オクシデンタレ・エルである請求項1に
記載の物質。

(3) 請求項1に記載のアナカルジウム・オクシデ
ンタレから得ることができる物質の製造方法であ
って、アナカルジウム・オクシデンタレを溶媒で
抽出する段階、及び

得られた抽出物を粗体クロマトグラフィーに掛け
て精製する段階

を包含することを特徴とする方法。

(4) 前記アナカルジウム・オクシデンタレがアナ
カルジウム・オクシデンタレ・エルである請求項

3に記載の方法。

⑤ 前記述様が炭化水素溶液、ハロゲン化炭化水素溶液、アルコール溶液、又はこれらの混合溶液である請求項3又は4に記載の方法。

⑥ 前記炭化水素溶液がヘキサンである請求項5に記載の方法。

⑦ 前記ハロゲン化炭化水素溶液がクロロホルムである請求項5に記載の方法。

⑧ 前記アルコール溶液がメタノールである請求項5に記載の方法。

⑨ 前記液体クロマトグラフィーがシリカゲルクロマトグラフィー及び分子ふるいクロマトグラフィーを包含する請求項3～8のいずれか一項に記載の方法。

⑩ 請求項1に記載のアナカルジウム・オクシデンタレから得ることができる物質を有効成分として含有する抗腫瘍剤。

いと考えられている。

癌遺伝子は α -rc、 τ -rc、 m -rcなどに代表される幾つかのグループに分類することができるが、最も研究の進んでいるのは α -rcファミリーの癌遺伝子である。この癌遺伝子産物はタンパク質中のチロシン残基を特異的にリン酸化する活性、すなわちチロシンキナーゼ活性をもち、この活性が細胞の癌化を引起すのに重要な役割を果たしていると考えられている (M. S. Celli et al., Nature, 285, 161～163 (1980); T. Hunter and B. H. Settle, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1311～1315 (1980))。また、上皮増殖因子 (EGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF)、インスリンなどの増殖因子受容体にも α -rcファミリーの癌遺伝子産物と類似したアミノ酸配列のドメインがありチロシンキナーゼ活性をもつことが知られている (J. B. Settle et al., Nature, 307, 521～523

⑪ 前記アナカルジウム・オクシデンタレがアナカルジウム・オクシデンタレ・エルである請求項11に記載の抗腫瘍剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、アナカルジウム・オクシデンタレ (*Anacardium occidentale*) から得ることができる新規の物質、その製造方法及び該物質を有効成分として含有する抗腫瘍剤に関するもの。並びに、この物質はチロシンキナーゼ阻害活性及び β -ガルコシダーゼ阻害活性を有することを特徴としている。

(従来の技術)

チロシンキナーゼ阻害剤：

癌遺伝子は種々のヒト細胞において点突然変異、転座、増幅などの異常を起こしている例が数多く見い出され、癌の形成に重要な役割を果たしている

(1984)。さらに、癌遺伝子のうち少なくともいくつかは本来正常な細胞の増殖に重要な役割を果たしている増殖因子や増殖因子受容体の遺伝子の変化したものであることが判明している (T. Taniguchi et al., Cell, 35, 71～78 (1983); C. L. Biegel et al., Cell, 35, 649～656 (1983))。

このため、癌遺伝子産物の機能を阻害する物質の開発が、癌の基礎研究及び化学療法の面から重要視されてきた。これまでに開発されたチロシンキナーゼ阻害剤として、ゲニステイン (T. Akaike et al., J. Biol. Chem., 262, 5592～5595 (1987))、エルプスタチン (B. Settle et al., J. Antibiot., 41, 171～173 (1988))、ハーピマイシン A、(T. Settle et al., Nat. Cell. Biol., 1, 2191～2206 (1988))、スタクロスボリン (中野洋文ら (1991) 日本農芸化学会昭和62年度大会講演要旨集、P-212, 28-1) などの微生物産生物質、並びに S-T

(1) (T. Saito) ら、 Chem. Pharm. Bull. 15, 376-381 (1981) のような化学的に合成された物質が知られている。

β-グルコシダーゼ阻害剤：

癌による死因の多くが、直接又は間接的に転移 (metastasis) に關係している。癌転移においては、細胞表面に存在する糖タンパク質及び糖脂質が介在することが知られており、従って、β-グルコシダーゼが癌細胞の表面に何らかの関与をしているものと考えられている。実際、公知のβ-グルコシダーゼ阻害剤であるカスタノスペルミンは転移抑制能のあることが報告されている (U. S. Patents. 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 5510, 5511, 5512, 5513, 5514, 5515, 5516, 5517, 5518, 5519, 5520, 5521, 5522, 5523, 5524, 5525, 5526, 5527, 5528, 5529, 5530, 5531, 5532, 5533, 5534, 5535, 5536, 5537, 5538, 5539, 5540, 5541, 5542, 5543, 5544, 5545, 5546, 5547, 5548, 5549, 55410, 55411, 55412, 55413, 55414, 55415, 55416, 55417, 55418, 55419, 55420, 55421, 55422, 55423, 55424, 55425, 55426, 55427, 55428, 55429, 55430, 55431, 55432, 55433, 55434, 55435, 55436, 55437, 55438, 55439, 55440, 55441, 55442, 55443, 55444, 55445, 55446, 55447, 55448, 55449, 55450, 55451, 55452, 55453, 55454, 55455, 55456, 55457, 55458, 55459, 55460, 55461, 55462, 55463, 55464, 55465, 55466, 55467, 55468, 55469, 55470, 55471, 55472, 55473, 55474, 55475, 55476, 55477, 55478, 55479, 55480, 55481, 55482, 55483, 55484, 55485, 55486, 55487, 55488, 55489, 55490, 55491, 55492, 55493, 55494, 55495, 55496, 55497, 55498, 55499, 554100, 554101, 554102, 554103, 554104, 554105, 554106, 554107, 554108, 554109, 554110, 554111, 554112, 554113, 554114, 554115, 554116, 554117, 554118, 554119, 554120, 554121, 554122, 554123, 554124, 554125, 554126, 554127, 554128, 554129, 554130, 554131, 554132, 554133, 554134, 554135, 554136, 554137, 554138, 554139, 554140, 554141, 554142, 554143, 554144, 554145, 554146, 554147, 554148, 554149, 554150, 554151, 554152, 554153, 554154, 554155, 554156, 554157, 554158, 554159, 554160, 554161, 554162, 554163, 554164, 554165, 554166, 554167, 554168, 554169, 554170, 554171, 554172, 554173, 554174, 554175, 554176, 554177, 554178, 554179, 554180, 554181, 554182, 554183, 554184, 554185, 554186, 554187, 554188, 554189, 554190, 554191, 554192, 554193, 554194, 554195, 554196, 554197, 554198, 554199, 554200, 554201, 554202, 554203, 554204, 554205, 554206, 554207, 554208, 554209, 554210, 554211, 554212, 554213, 554214, 554215, 554216, 554217, 554218, 554219, 554220, 554221, 554222, 554223, 554224, 554225, 554226, 554227, 554228, 554229, 554230, 554231, 554232, 554233, 554234, 554235, 554236, 554237, 554238, 554239, 554240, 554241, 554242, 554243, 554244, 554245, 554246, 554247, 554248, 554249, 554250, 554251, 554252, 554253, 554254, 554255, 554256, 554257, 554258, 554259, 554260, 554261, 554262, 554263, 554264, 554265, 554266, 554267, 554268, 554269, 554270, 554271, 554272, 554273, 554274, 554275, 554276, 554277, 554278, 554279, 554280, 554281, 554282, 554283, 554284, 554285, 554286, 554287, 554288, 554289, 554290, 554291, 554292, 554293, 554294, 554295, 554296, 554297, 554298, 554299, 554300, 554301, 554302, 554303, 554304, 554305, 554306, 554307, 554308, 554309, 554310, 554311, 554312, 554313, 554314, 554315, 554316, 554317, 554318, 554319, 554320, 554321, 554322, 554323, 554324, 554325, 554326, 554327, 554328, 554329, 554330, 554331, 554332, 554333, 554334, 554335, 554336, 554337, 554338, 554339, 554340, 554341, 554342, 554343, 554344, 554345, 554346, 554347, 554348, 554349, 554350, 554351, 554352, 554353, 554354, 554355, 554356, 554357, 554358, 554359, 554360, 554361, 554362, 554363, 554364, 554365, 554366, 554367, 554368, 554369, 554370, 554371, 554372, 554373, 554374, 554375, 554376, 554377, 554378, 554379, 554380, 554381, 554382, 554383, 554384, 554385, 554386, 554387, 554388, 554389, 554390, 554391, 554392, 554393, 554394, 554395, 554396, 554397, 554398, 554399, 554400, 554401, 554402, 554403, 554404, 554405, 554406, 554407, 554408, 554409, 554410, 554411, 554412, 554413, 554414, 554415, 554416, 554417, 554418, 554419, 554420, 554421, 554422, 554423, 554424, 554425, 554426, 554427, 554428, 554429, 554430, 554431, 554432, 554433, 554434, 554435, 554436, 554437, 554438, 554439, 554440, 554441, 554442, 554443, 554444, 554445, 554446, 554447, 554448, 554449, 554450, 554451, 554452, 554453, 554454, 554455, 554456, 554457, 554458, 554459, 554460, 554461, 554462, 554463, 554464, 554465, 554466, 554467, 554468, 554469, 554470, 554471, 554472, 554473, 554474, 554475, 554476, 554477, 554478, 554479, 554480, 554481, 554482, 554483, 554484, 554485, 554486, 554487, 554488, 554489, 554490, 554491, 554492, 554493, 554494, 554495, 554496, 554497, 554498, 554499, 554500, 554501, 554502, 554503, 554504, 554505, 554506, 554507, 554508, 554509, 554510, 554511, 554512, 554513, 554514, 554515, 554516, 554517, 554518, 554519, 554520, 554521, 554522, 554523, 554524, 554525, 554526, 554527, 554528, 554529, 554530, 554531, 554532, 554533, 554534, 554535, 554536, 554537, 554538, 554539, 554540, 554541, 554542, 554543, 554544, 554545, 554546, 554547, 554548, 554549, 554550, 554551, 554552, 554553, 554554, 554555, 554556, 554557, 554558, 554559, 554560, 554561, 554562, 554563, 554564, 554565, 554566, 554567, 554568, 554569, 554570, 554571, 554572, 554573, 554574, 554575, 554576, 554577, 554578, 554579, 554580, 554581, 554582, 554583, 554584, 554585, 554586, 554587, 554588, 554589, 554590, 554591, 554592, 554593, 554594, 554595, 554596, 554597, 554598, 554599, 554600, 554601, 554602, 554603, 554604, 554605, 554606, 554607, 554608, 554609, 554610, 554611, 554612, 554613, 554614, 554615, 554616, 554617, 554618, 554619, 554620, 554621, 554622, 554623, 554624, 554625, 554626, 554627, 554628, 554629, 554630, 554631, 554632, 554633, 554634, 554635, 554636, 554637, 554638, 554639, 554640, 554641, 554642, 554643, 554644, 554645, 554646, 554647, 554648, 554649, 554650, 554651, 554652, 554653, 554654, 554655, 554656, 554657, 554658, 554659, 554660, 554661, 554662, 554663, 554664, 554665, 554666, 554667, 554668, 554669, 554670, 554671, 554672, 554673, 554674, 554675, 554676, 554677, 554678, 554679, 554680, 554681, 554682, 554683, 554684, 554685, 554686, 554687, 554688, 554689, 554690, 554691, 554692, 554693, 554694, 554695, 554696, 554697, 554698, 554699, 554700, 554701, 554702, 554703, 554704, 554705, 554706, 554707, 554708, 554709, 554710, 554711, 554712, 554713, 554714, 554715, 554716, 554717, 554718, 554719, 554720, 554721, 554722, 554723, 554724, 554725, 554726, 554727, 554728, 554729, 554730, 554731, 554732, 554733, 554734, 554735, 554736, 554737, 554738, 554739, 554740, 554741, 554742, 554743, 554744, 554745, 554746, 554747, 554748, 554749, 554750, 554751, 554752, 554753, 554754, 554755, 554756, 554757, 554758, 554759, 554760, 554761, 554762, 554763, 554764, 554765, 554766, 554767, 554768, 554769, 554770, 554771, 554772, 554773, 554774, 554775, 554776, 554777, 554778, 554779, 554780, 554781, 554782, 554783, 554784, 554785, 554786, 554787, 554788, 554789, 554790, 554791, 554792, 554793, 554794, 554795, 554796, 554797, 554798, 554799, 554800, 554801, 554802, 554803, 554804, 554805, 554806, 554807, 554808, 554809, 554810, 554811, 554812, 554813, 554814, 554815, 554816, 554817, 554818, 554819, 554820, 554821, 554822, 554823, 554824, 554825, 554826, 554827, 554828, 554829, 554830, 554831, 554832, 554833, 554834, 554835, 554836, 554837, 554838, 554839, 554840, 554841, 554842, 554843, 554844, 554845, 554846, 554847, 554848, 554849, 554850, 554851, 554852, 554853, 554854, 554855, 554856, 554857, 554858, 554859, 554860, 554861, 554862, 554863, 554864, 554865, 554866, 554867, 554868, 554869, 554870, 554871, 554872, 554873, 554874, 554875, 554876, 554877, 554878, 554879, 554880, 554881, 554882, 554883, 554884, 554885, 554886, 554887, 554888, 554889, 554890, 554891, 554892, 554893, 554894, 554895, 554896, 554897, 554898, 554899, 554900, 554901, 554902, 554903, 554904, 554905, 554906, 554907, 554908, 554909, 554910, 554911, 554912, 554913, 554914, 554915, 554916, 554917, 554918, 554919, 554920, 554921, 554922, 554923, 554924, 554925, 554926, 554927, 554928, 554929, 554930, 554931, 554932, 554933, 554934, 554935, 554936, 554937, 554938, 554939, 554940, 554941, 554942, 554943, 554944, 554945, 554946, 554947, 554948, 554949, 554950, 554951, 554952, 554953, 554954, 554955, 554956, 554957, 554958, 554959, 554960, 554961, 554962, 554963, 554964, 554965, 554966, 554967, 554968, 554969, 554970, 554971, 554972, 554973, 554974, 554975, 554976, 554977, 554978, 554979, 554980, 554981, 554982, 554983, 554984, 554985, 554986, 554987, 554988, 554989, 554990, 554991, 554992, 554993, 554994, 554995, 554996, 554997, 554998, 554999, 554100, 554101, 554102, 554103, 554104, 554105, 554106, 554107, 554108, 554109, 554110, 554111, 554112, 554113, 554114, 554115, 554116, 554117, 554118, 554119, 554120, 554121, 554122, 554123, 554124, 554125, 554126, 554127, 554128, 554129, 554130, 554131, 554132, 554133, 554134, 554135, 554136, 554137, 554138,

ム・オクシデンタレとしては、チロシンキナーゼ阻害活性及び/又は β -グルコシダーゼ阻害活性成分を含有する全ての植物のものを包含するが、好ましくはアナカルジウム・オクシデンタレ・エル (Anacardium occidentale L.) である。

原料のアナカルジウム・オクシデンタレは、その果皮又は果皮を含む種子(もしくは實)が好ましく、保存時の腐敗を防止するために乾燥し、さらに粉碎したものを使用するのが好ましい。

また、抽出段階で使用する脱化水素溶媒としては、脱化水素類たとえばベンタン、ヘキサン、ヘブタン、オクタン、石油エーテル、石油ベンジン、リグロイン、ベンゼン、トルエン、キシレン、エチルベンゼンなど; ハロゲン化脱化水素類たとえばクロロホルム、メチレンクロライド、四塩化炭素、など; アルコール類たとえばメタノール、エタノール、ブタノール、など; 又はこれらの混合

活性をもつ成分を単離するために、さらに抽出物を直接又は一旦濃縮した後に液体クロマトグラフィーに掛けて精製する。

本発明の実施態様によれば、液体クロマトグラフィーはシリカゲルクロマトグラフィーと分子ふるいクロマトグラフィーとを包含し得る。さらに詳しくは、抽出段階で得られた抽出物を一旦濃縮した後、【0001-01】を充填したカラムを用い、且つクロロホルム:メタノール = 100:1 ~ 100:5 の濃縮系でシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行うこと; 濃縮系をクロロホルム:メタノール:還アンモニア水 = 100:1:1.1 ~ 100:5:1.1 に代えて同様にクロマトグラフィーを行うこと; 並びに【0001-01】を充填したカラムを用い、且つメタノールを濃縮系として分子ふるいクロマトグラフィーを行うことによって本発明物質を精製することができる。

溶媒が挙げられ、特にヘキサン、クロロホルム、メタノールが好適である。もちろん、これらの溶媒以外の同様の抽出能力をもつ他の溶媒も使用し得る。有機溶媒の量は特に限定されないが、本発明の單離物質が抽出され得る量であればよく、好ましくはアナカルジウム・オクシデンタレの果皮を含む種子(もしくは實) 50g (乾燥重量) 当たり 100 ~ 1000ml である。抽出量も特に限定されないが、本発明の單離物質が抽出され得る量であればよく、好ましくは室温 ~ 45°C、より好ましくは室温 ~ 45°C である。抽出時間は温度により異なるが、例えば室温 ~ 45°C で抽出する場合 1 ~ 12 時間である。抽出段階での圧力は特に限定されないが、抽出は通常常圧で実施される。なお、抽出は抽出率に応じて 2 回以上繰り返してもよい。

アナカルジウム・オクシデンタレ抽出物からさらにチロシンキナーゼ/ β -グルコシダーゼ阻害

チロシンキナーゼ阻害活性及び β -グルコシダーゼ阻害活性をもつことを特徴とする本発明物質は以下の物理化学的及び分光学的性質を有する。

(1) 溶媒に対する溶解性: ヘキサン、クロロホルム、酢酸エチル、メタノール、ジメチルスルホキシドに可溶性であり、水に不溶性である。

(2) 薄層クロマトグラフィー: $R_f = 0.45$ (担体シリカゲル; 展開溶媒クロロホルム:メタノール:還アンモニア水 = 10:2:1.5)。

(3) UVスペクトル: $\lambda_{\text{max}} = 310 \text{ nm}$ (溶媒メタノール) (第 1 図参照)。

(4) $^1\text{H-NMR}$ スペクトル: 展開溶媒クロロホルム: $\delta = 0.9$: 1.1, 1.1 ~ 1.7, 1.8, 2.75, 3.0, 3.3, 3.4, 4.55, 6.15, 7.5 (第 2 A 及び 2 B 図参照)。

さらに、本発明物質の抗腫瘍活性は弱く、例えば

Staphylococcus aureus TGA 2032, Bacillus subtilis, Bacillus subtilis TBL 1-551, Bacillus subtilis PC1 219, Bacillus cereus ATCC 10702 に対する最小阻止濃度 (MIC) は 12.5 倍 / ml、E. coli K-12, Candida albicans 3147 に対する MIC は 100 倍 / ml 以上、及び Epithelial keratinocyte A3 に対する MIC は 51 倍 / ml 以上であった。

本発明物質はチロシンキナーゼ阻害活性を有することを特徴としている。具体的には、アナカルジウム・オクシデンタレから本発明方法によって単離された物質を、ヒト上皮癌 A431 細胞から調製した細胞膜 (チロシンキナーゼ含有) に EGF、[γ -³²P] ATP、合成ペプチド基質 RR-SRC と共に作用させると、リン酸化された RR-SRC の放射活性の測定から、本発明物質が EGF 受容体のチロシンリン酸化を阻害することが

ときの阻止濃度 IC₅₀ は 19 倍 / ml であった。

本発明物質は、正常細胞に対してよりもむしろ腫瘍細胞に対して特に強い細胞毒性を示した。即ち、マウス細胞系 L1210 に対しては 1000 倍 / ml でもその細胞増殖を全く阻害せず、一方、ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞に対しては 125 倍 / ml で強い細胞毒性を示した。この結果は、本発明物質が低毒性であり且つ抗腫瘍作用を有することを示唆するものである。

従って、本発明はさらに、本発明の物質を有効成分として含有する抗腫瘍剤をも提供する。

本発明の抗腫瘍剤は主として経口投与されるが、緊急を要する場合には静脈内投与を行ってもよく、本発明は投与方法によって特に限定されない。成人 1 日当たりの投与量は投与方法によって異なる。主たる投与方法である経口投与の場合で言えば、1.1~1.1 g が好ましい 1 日当たりの投与量であ

った。そのチロシンキナーゼ阻害活性は、後述の実施例に記載の方法を用いて再びヘキサン抽出物でテストしたとき、最終濃度 100 倍 / ml で 51% のチロシンリン酸化阻害を示した (第 1 表)。また、チロシンリン酸化を 50% 阻害するときの阻害濃度 IC₅₀ は 19 倍 / ml であった。

さらにまた、本発明物質は β -グルコシダーゼ阻害活性を有することを特徴としている。具体的には、酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) 中、アーモンド由来の β -グルコシダーゼを酵素とし且つパラニトロフェニル- β -D-グルコピラノシドを基質とした加水分解反応系に、本発明の阻害剤を添加したときの阻害率を p-ニトロフェノールの生成量を測定することにより決定した。その結果、本発明物質は、最終濃度 100 倍 / ml で 51% の β -グルコシダーゼ阻害を示した (第 2 表)。

また、 β -グルコシダーゼ活性を 50% 阻害する

ときの阻止濃度 IC₅₀ は 19 倍 / ml であった。

本発明物質は、正常細胞に対してよりもむしろ腫瘍細胞に対して特に強い細胞毒性を示した。即ち、マウス細胞系 L1210 に対しては 1000 倍 / ml でもその細胞増殖を全く阻害せず、一方、ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞に対しては 125 倍 / ml で強い細胞毒性を示した。この結果は、本発明物質が低毒性であり且つ抗腫瘍作用を有することを示唆するものである。

(実施例)

[1] アナカルジウム・オクシデンタレからのチロシンキナーゼ / β -グルコシダーゼ阻害活性を有する物質の調製

天日で乾燥後、粉碎されたアナカルジウム・オクシデンタレ・エル (Bacillus occidentalis L.) の果皮を含む種子 (もしくは實) 51 g を加熱器、攪拌機及びコンデンサーを備え付けた I 型のガラス容器に入れ、ヘキサン 200 ml を加え、攪拌下、室温で半日間抽出した。抽出後、滤過により抽出液と固体残渣とに分離し、次いで固体残渣を

両端の操作でさらに2回抽出した。3回分の抽出液を合わせて減圧下にヘキサンを加熱留去し、ついで得られた残渣を減圧乾燥して茶褐色の粘稠液状物質16.1gを得た。この液状物質をヘキサン抽出物と称する。

次に、この液状物質(11g)をSILICAGEL 60(メルク社製)を充填したシリカゲルカラム(31φ×12cm)上に載置し、クロロホルム：メタノールの混合溶媒 100: 0, 100: 2 及び 100: 5 を用いて100mlずつこの順番で脱脂溶出した。このとき、活性成分は溶媒比 100: 5 で抽出させた画分中に回収された。活性画分を集め、減圧下に溶媒を蒸発乾固した。

得られた残渣を上記と同様のカラム上に載置し、クロロホルム：メタノール：酢酸アンモニア水の混合溶媒 100: 0: 1.1, 100: 1: 1.1, 100: 2: 1.1 及び 100: 5: 1.1 を用いてそれ

チル、メタノール、ジメチルスルホキシドに可溶、水に不溶である。

(c) UVスペクトル：濃度10mg/ml-メタノールのときλ_{max}... 311 nm.

(d) ¹H-NMRスペクトル：(CDCl₃, δ) 1.3, 1.4~1.7, 2.0, 2.13, 5.1, 5.3, 5.4, 6.55, 6.55, 7.5 ppm.

[B] A(3) 細胞膜の調製

ヒト上皮癌A(3)細胞を底面積175cm²のプラスチックフラスコ中で5%牛血清を含むD M E M (Biblage's modified Eagle's medium)で37℃で培養した。培養を捨て、ハーベスティングソルーション(0.15Mホウ酸、0.15M NaCl、1 mM MgCl₂、1 mM CaCl₂、pH 7.2)適量で洗浄後ハーベスティングソルーションを少量加えて、増殖したA(3)細胞をラバーポリースマンではがし、150×gで10分間遠心して沈殿した細胞を集めた。

それ100mlずつこの順番で脱脂溶出した。このとき、活性成分は溶媒比 100: 5: 1.1 で抽出させた画分中に回収された。活性画分を含む抽出液を減圧乾固した。

更に、得られた残渣をSILICAGEL 60(メルク社製)を充填したカラム(31φ×310cm)上に載置し、メタノールを溶媒として分子ふるいクロマトグラフィーを行い、活性画分を集め、減圧下に乾固して赤褐色油状物25mgを得た。この物質はチロシンキナーゼ阻害活性とダーグルコシダーゼ阻害活性とともに有していた。この阻害剤の物理化学的及び分光学的性質は以下のとおりであった。

(a) シリカゲル薄層クロマトグラフィー：

$$R_f = 0.16 \text{ (CHCl}_3 : \text{ MeOH : H}_2\text{O} = 10 : 2 \\ 1.15).$$

(b) 溶解性：ヘキサン、クロロホルム、酢酸エ

チルの体積と等量のハーベスティングソルーションを加えよく懸濁させ、-10℃で保存した。

以下に示した手順は0℃で行った。上記で得たA(3)細胞の懸濁液をエクストラクティングソルーション(0.15Mホウ酸、0.15M EDTA、pH 10.2)100倍量中に滴下し分散させた。10分間攪拌することにより、細胞は浸透圧で破裂し細胞膜は断片状になり、細胞質はゲル状になった。

8倍量の0.15Mホウ酸溶液(pH 10.2)を添加し5分間攪拌後、ナイロンガーゼでゲル状の細胞質を除き(50×gで10分間遠心して得た上澄みを12.000×gで30分間遠心後得られた粗細胞膜画分を33% (v/v) ショ糖を含むPBS (phosphate buffered saline) 液液上にのせ、その上にPBSを少量のせて24.000×gで1時間遠心分離を行った。33% ショ糖 PBS 液液界面に集まつた細胞膜断片を集め、PBSを添加し12.000×gで10分

遠心分離を行い、得られた沈殿を A431 細胞液標品とした。

[Ⅲ] チロシンキナーゼ阻害活性の測定

ヒト上皮癌 A431 細胞から調製した細胞液標液 (4 mg/ml 蛋白質) 10 倍に、EGF (1 μg/ml) 6 倍を含有する 10 mM HEPES バッファ (HEPES 11.8 g, MnCl₂ 19.7 mg 及び BSA 12.5 mg/100 ml 水, pH 7.2) 増液 20 倍と上記 [I] で調製した本発明物質 (2 mg/ml; 摘出ジメチルスルホキシド) 6 倍とを加え、37°C で 10 分間ブレインキュベートした。次に、ペプチド基質 RR-SRC (ペプチド研究所製; 12.5 mg/ml) 5 倍及び [³²P] ATP (NEN 製; 1 Ci/mmol) 10 倍をさらに加えて 37°C で 10 分間反応させた。10% トリクロロ酢酸水溶液 25 倍と牛血清アルブミン (10 mg/ml) 6 倍とを加えて反応を止めた後、13,000 × g で 5 分間遠心分離を行い、上清を得た。この上清

(15 ml) をフォスフォセルロースペーパー (ワーマン P-11, 2 cm × 2 cm) に吸着させた後、30% 酢酸水溶液中で 10 分間洗浄し、さらに 15% 酢酸水溶液中で 10 分間ずつ 3 回洗浄した。最後に、ペーパーをアセトン洗浄、乾燥し、フォスフォセルロース紙の ³²P-放射活性を、チエレンコフ効果により液体シンチレーションカウンター (Packard 社製 LS-3111T) を用いて測定した。このとき、本発明物質を添加しない場合のチロシンキナーゼ活性を 100% として、阻害率を算出した。結果を第 1 表に示した。

第 1 表

阻害物質濃度 (1)	阻害率 (%)
0.75	11
1	1
6	21
12.5	42
25	67.5
100	100

1) 実験例 [I] で調製されたヘキサン抽出物。

本発明物質 (ヘキサン抽出物) では、濃度依存的にチロシンキナーゼ阻害率が向上し、濃度 100 mg/ml のとき阻害率 100% を示した。また、阻害率 51% となるときの阻害剤濃度 (IC₅₀) は 12.5 mg/ml であった。

[IV] β -グルコシダーゼ阻害活性

10 mM の酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.3) 100 μl を試験管に入れ、それにアーモンド由来 β -グルコシダーゼ (シグマ社, 1.2 mg/ml) を 6 倍、本発明物質を 5 倍 (20 mg/ml) ずつ添加し 37°C で、3 分間ブレインキュベートした。本発明物質は予め DMSO に溶解させて用いた。基質として 5 mM の p-ニトロフェニル- β -グルコビラノシド (シグマ社) を 5 倍添加後、10 分間 37°C でインキュベートした。10 分後、1 M グリシンバッファ (pH 10.0) を 2.5 ml 添加して反応を止め、分光光度計 (東京 PHOTOELECTRIC CO. LTD.) で 410 nm で反応後に生じる、パラニトロフェノールの吸光度を測定した。このとき、本発明阻害剤を添加しない場合の β -グルコシダーゼ活性を 100% として阻害率を算出した。

その結果、本発明物質は表 2 に示すような β -

グルコシダーゼ阻害活性をもつことが明らかとな
った。また阻害曲線から求めた I C₅₀ は 19 時 / ml
であった。

第 2 表

阻害物質濃度 ⁽¹⁾ (時 / ml)	阻害率 (%)
6	1
12.5	11
25	13
50	16
100	16

(1) 実施例 [1] で調製された本発明物質。

(発明の効果)

アナカルシウム・オクシデンタレから得られた
本発明物質はチロシンキナーゼ阻害活性と B グル
コシダーゼ阻害活性をともに有し、且つ低毒性で

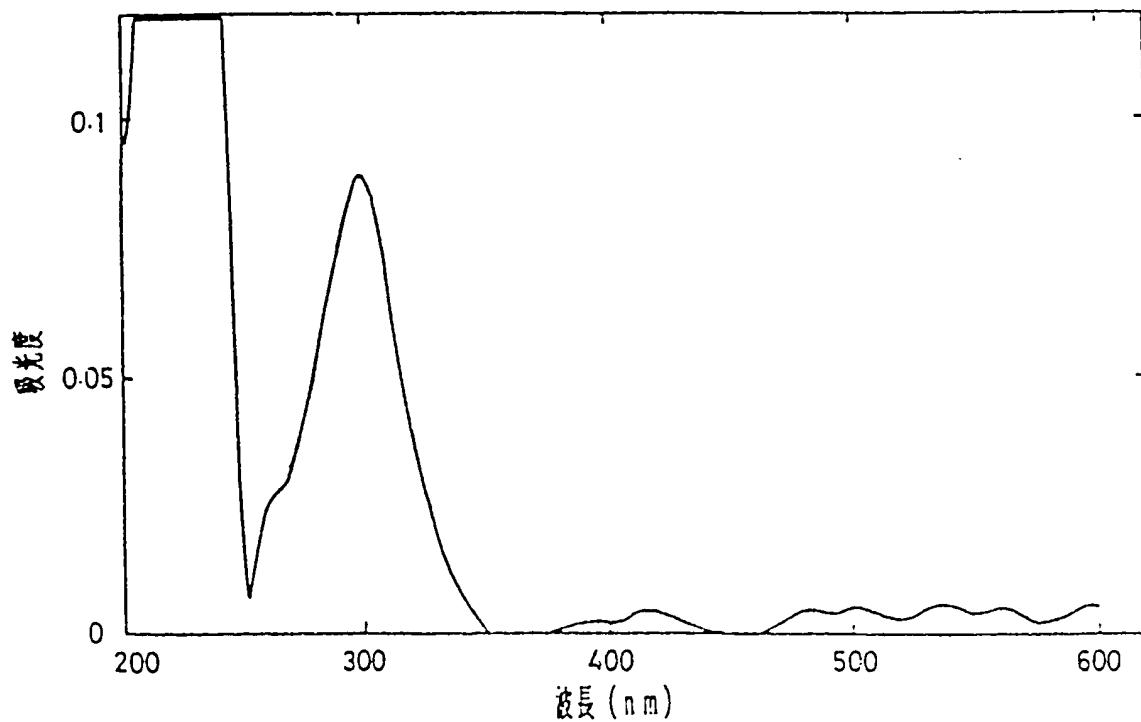
あるため、この物質は癌伝子産物の構造の解明
や癌の化学療法に有効に使用し得ることが期待さ
れる。

4. 図面の簡単な説明

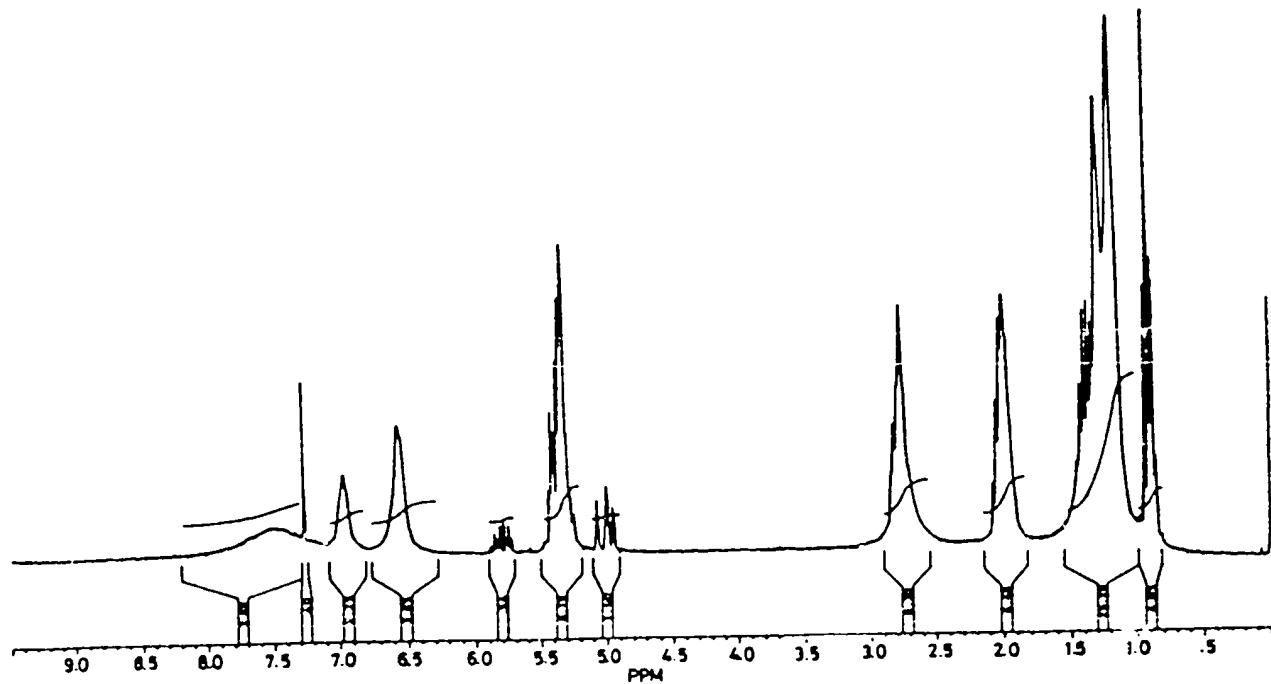
第 1 図は、アナカルシウム・オクシデンタレ・
エルの果皮を含む種子から単離した本発明物質の
UV スペクトルであり、また第 2 A 及び第 2 B 図は
その ¹H - NMR スペクトルである。

著者人 佐藤 政氏会社
著者人 エーテル株式会社
著者人 審澤 一夫
代理人 有澤士 田口 義
代理人 有澤士 中村
代理人 有澤士 舟山
代理人 有澤士 雄至武

第 1 図



第2A図



第2B図

